Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Elektronenmikroskopische Untersuchung über Feinstruktur, Packung und Dicke der Kollagenfibrillen aus dem Bindegewebe des harten Gaumens der Ratte

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Hermann Friedrich Gleistein
aus Hamburg

1973

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Elektronenmikroskopische Untersuchung über Feinstruktur, Packung und Dicke der Kollagenfibrillen aus dem Bindegewebe des harten Gaumens der Ratte

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Hermann Friedrich Gleistein
aus Hamburg

Referent: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Hans Lenz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24. November 1973

INHALT

1. Einleitung

2. Material und Methode

3. Befunde

4. Diskussion

5. Literatur

6. Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/lA41552710_0100

EINLEITUNG

Nach elektronenoptischen Untersuchungen über den Feinbau der Sehne lag es nahe, ähnliche Untersuchungen über ein nicht auf Zug und Biegung, sondern auf Druck und Tangentialschub beanspruchtes faserreiches Bindegewebe anzustellen. Wir wählten dazu den harten Gaumen der Ratte.

Das Bindegewebe des harten Gaumens nimmt in der Reihe der straffen Bindegewebe des Säugetiers insofern eine besondere Stellung ein, als eine relativ dünne Gewebsschicht beim Zerkleinern der Nahrung erheblichen Druck- und Tangentialschubbelastungen ausgesetzt ist. Man darf daher annehmen, daß seine submikroskopische Textur von der des auf Zug und Biegung beanspruchten Sehnengewebes abweicht, und daß statt eines parallelen Verlaufs der Kollagenfaserbündel ein Geflecht aus diesen vorgefunden wird. Eine netzartige räumliche Verflechtung würde bewirken, daß bei Einwirken von Druckkräften auf das Gewebe die Faserbündel sich entsprechend der Druckresultante ausrichten und - vergleichbar den kollagenen Fasern des Parodontiums bei axialer Belastung des Zahnes - die auftretenden Druckkräfte in Zugkräfte umwandeln, also in diejenige Form der Belastung, der die kollagene Faser dank ihrer Zugfestigkeit am besten gewachsen ist. So hätte die dünne Bindegewebsschicht des harten Gaumens die Funktion eines Polsters, das den Druck auf das Periost abfängt und durch seine Festigkeit eine Stauung der Gefäße und Kapillaren unter der Kaufunktion verhindert.

Es gilt zu klären, durch welche strukturellen Eigenschaften sich das dem harten Gaumen

entnommene Bindegewebe vom Sehnengewebe einerseits und andererseits vom retikulären Bindegewebe der inneren Organe unterscheidet, und zwar im Hinblick auf das Verhältnis der interfibrillären Kittsubstanz zu den Fibrillen, die Anordnung der Fibrillen selbst (verflochten oder überwiegend parallel verlaufend) und schließlich die Fibrillendicke. Außerdem soll am Beispiel zweier unmittelbar benachbarter, doch unterschiedlich beanspruchter Bindegewebsschichten (harter Gaumen - weicher Gaumen) die Beziehung zwischen dem Kollagenanteil am Bindegewebe-Gesamtvolumen und der funktionellen Belastung der beiden Gewebe dargestellt werden.

Die Kollagenfasern stellen sich im Lichtmikroskop als aus zarten, glatten, 0,2 - 0,5μ dicken Fäserchen zusammengesetzt dar. Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung erkennt man, daß diese Fäserchen aus mehreren Fibrillen bestehen, den sog. Kollagenfibrillen. Zwischen den Fibrillen liegt eine ungeformte Matrix, die sog. "Kittsubstanz" (cementing substance), die zusammen mit den Fibrillen die Interzellularsubstanz (ground substance) ausmacht. Der mengenmäßige Anteil der Kittsubstanz ist kennzeichnend und funktionsbestimmend für die verschiedenen Arten des Bindegewebes. Aus dem Kittsubstanzreichtum der Cornea z.B. ergibt sich infolge der Maskierung der (dünnen) Fibrillen und der Angleichung der Brechungsindices beider Grundsubstanzkomponenten (Schwarz et al. 1966) die Transparenz, und das Überwiegen des fibrillären Anteils in der Sehne gewährleistet deren Zug-

festigkeit und mechanische Belastbarkeit. Darüber hinaus kennzeichnet der Kittsubstanzanteil eines sich differenzierenden (nicht auf einer frühembryonalen Stufe verharrenden) Bindegewebes den Grad seiner funktionellen Reifung: Mechanisch hoch beanspruchtes Bindegewebe enthält am Ende der Differenzierung nur noch wenig amorphe Kittsubstanz.

Hauptbestandteile dieser Kittsubstanz sind saure oder neutrale Polysaccharide sowie Mucoproteine oder Glycoproteine - je nach ihrem Hexosamingehalt.

Auf das Vorhandensein der Kohlenhydratkomponente stützt sich auch ein Verfahren zur Unterscheidung kollagener und argyrophiler Fasern, das als Bindegewebs-Versilberungsmethode (nach Gömöri) von Dettmer, Neckel und Ruska (1951) sowie von v.Herrath und Dettmer (1951) und Dettmer (1952) aus der Histologie in die Technik der Elektronenmikroskopie übernommen worden ist. Kollagene und argyrophile Fasern lassen sich im elektronenoptischen Bild lediglich durch den Dickenunterschied der Fibrillen gegeneinander abgrenzen, während im histologischen Präparat die argyrophilen Fasern nach Versilberung violett bis schwarz und die kollagenen Fasern braunrot erscheinen. Nach Perjodsäure-Versilberung eines durch Beschallung gewonnenen Zupfpräparates sind jedoch auch elektronenmikroskopisch die Faserarten einigermaßen klar zu unterscheiden: Die argyrophilen Fibrillen versilbern sich oberflächlich und zeigen keine Querstreifung, während die kollagenen Fibrillen eine reine Innenversilberung aufweisen. Dementsprechend gibt der Versilberungsmodus auch Aufschluß über den Reifungsgrad des Bindegewebes: Embryo-

nales Bindegewebe ist unregelmäßig außenversilbert und läßt kaum Querstreifung erkennen; im Retikulinstadium ordnen sich die Silbergranula bereits im Rhythmus der Querstreifungsperiode in Gruppen, die zu den D-Teilen in Beziehung stehen, außen um die Fibrillen herum an (periodische Außenversilberung), und die reife Kollagenfibrille in der Gebrauchsphase schließlich zeichnet sich durch eine Einlagerung von Silber in die D-Teile der Fibrillen aus (Schwarz 1955).

Diese funktionsbedingten Differenzierungsvorgänge an den Fibrillen spielen sich allerdings nicht in jedem Bindegewebe ab. Bradytrophe Gewebe wie Cornea und Knorpel behalten zeitlebens ihren embryonalen Status,und ihre Fibrillen zeigen auch im Alter noch eine unregelmäßige Außenversilberung, während andererseits die Fibrillen der Interstitien schon vor Funktionsbeginn regelmäßig außenversilbert sind (Schwarz 1960).

Es gibt allerdings auch Übergänge im Verhalten gegenüber der Versilberung: Dünne Kollagenfibrillen gleichen in der Art der Silberanlagerung dem Retikulin, so daß man folgern kann, daß die Änderung in der Versilberung der wachsenden Fibrillendicke parallel geht. Die Grenzen sind somit fließend und offenbar nicht grundsätzlicher Natur (v.Herrath u. Dettmer 1951).

Die Kollagenfibrille als wichtigstes Bauelement der Bindegewebsfaser weist eine periodische Querstreifung auf, die dadurch entsteht, daß in regelmäßigem Wechsel ein transparenterer (H-)Abschnitt von einem schattendichteren (D-) Abschnitt abgelöst wird. Diese Querstreifung der Kollagenfibrille wurde zuerst von Schmitt,

Hall und Jakus (1942) beschrieben und von Wolpers (1944) bestätigt; die Länge der Periode beträgt im Mittel 640 Å mit einer Schwankungsbreite von 400 bis 820 Å. Wolpers (1948) führt die Schwankungen auf unterschiedliche Präparationstechniken zurück. Diese Periode entspricht den Reflexen bei der Kleinwinkel-Röntgenstrukturanalyse (Bear 1944).

Der makromolekulare Baustein der Fibrille, das Tropokollagenmolekül, das selbst aus drei in sich linksgewundenen und miteinander im Rechtssinn verdrillten, durch Wasserstoffbindungen quer zur Faserachse zusammengehaltenen Peptidketten ("coiled coil") besteht (Hörmann 1965), hat nach Boedtker und Doty (1956) eine Breite von 15 Å und eine Länge von 2800 Å; das ist rund das Vierfache der Breite einer Fibrillen-Querstreifungsperiode (ca 640 Å).

Nach Meinung von Schmitt und Hodge (1960) sind die durch lineare Polymerisation der fadenförmigen Tropokollagenmoleküle entstehenden Protofibrillen bei ihrer seitlichen Verknüpfung durch Nebenvalenzen um jeweils ein Viertel der Länge eines Tropokollagenmoleküls gegeneinander versetzt, also gestaffelt angeordnet. Infolge einer Häufung polarer und apolarer Molekülgruppen in einer bestimmten Sequenz zeigt das Tropokollagen-Makromolekül eine unterschiedliche Dichteverteilung über seine Länge. Die polaren Gruppen werden vermutlich durch saure und basische Aminosäurereste gebildet, die die Schwermetallionen der Kontrastierungs- oder Fixationsmittel binden und damit Orte höherer elektronischer Dichte schaffen: Die D-Teile der Querstreifungsperiode, die sich mit den H-Teilen abwechseln.

Einen Beweis für die Richtigkeit ihrer Annahme lieferten dieselben Autoren (1960) durch Übereinanderkopieren von vier Aufnahmen sogenannter "long spacing"-Filamente, einer aus Kollagenlösung durch Zusatz von ATP (Schmitt, Gross und Highberger 1953 und 1955) rekonstruierten, nur in vitro existierenden Fibrillenart, die sich darin von den natürlichen Fibrillen unterscheidet, daß die Protofibrillen nicht gestaffelt, sondern jeweils auf der gleichen Höhe liegen. Sie rückten vor jeder neuen Aufnahme das Negativ um ein Viertel der Länge dieses "long spacing"-Filaments weiter und erhielten als Summation der Dichteunterschiede auf der resultierenden Aufnahme die typische Querstreifungsperiodik von 640 Å.

Die Querstreifungsperiode läßt sich bei entsprechender Auflösung und Vergrößerung noch weiter in Bänder aufteilen. Die Anzahl der Bänder ist weitgehend von dem verwendeten Fixations- und Kontrastierungsmittel abhängig, wobei sich Phosphorwolframsäure und Uranylacetat als am günstigsten erwiesen haben (Schwarz 1961). Nemetschek, Grassmann und Hofmann (1955) konnten nach Kontrastierung durch Phosphorwolframsäure bis zu dreizehn Bänder unterschiedlicher Breite und Dichte innerhalb einer Querstreifungsperiode darstellen.

Tromans, Horne et al. (1962) haben nach dem von Brenner und Horne (1959) beschriebenen Verfahren der "negativen Kontrastierung" bei hohen Vergrößerungen innerhalb der D-Teile eine feine Längsstreifung beobachtet, die aus 15 - 20 Å dicken, parallel verlaufenden Filamenten besteht. Diese Filamente lassen nur

innerhalb der D-Teile einen annähernd parallelen Verlauf erkennen; in den helleren H-Abschnitten scheint die Parallelität aufgehoben. Da die Dicke der Filamente recht gut mit dem röntgeninterferometrisch ermittelten Querschnitt der Polypeptidketten-Helix von 14 Å übereinstimmt, betrachten die Autoren diese zarten Streifen als die Kollagen-Makromoleküle selbst.

Es gilt heute als sicher, daß die Kollagenmoleküleinheiten im endoplasmatischen Retikulum der Fibroblasten synthetisiert werden und erst im Extrazellulärraum zu den elektronenmikroskopisch sichtbaren Fibrillen polymerisieren, wobei die Mucopolysaccharide der Kittsubstanz die Stärke und Richtung der Fibrillen entscheidend beeinflussen. Über den Mechanismus der Ausschleusung der Tropokollagen-Moleküleinheiten aus dem Fibroblasten besteht noch keine endgültige Klarheit.

Quergeschnittene Fibrillen weisen keine elektronenoptisch einheitliche Struktur auf. Man erkennt oft einen dichteren Rand, der sich deutlich gegen die etwas transparentere Innenzone abhebt. Die naheliegende Vermutung, daß es sich um röhrenförmige Gebilde handeln müsse, wird scheinbar unterstützt durch die Aufnahmen schräggeschnittener Fibrillen aus der Parodontalmembran vom Menschen, die deutlich eine tubuläre Struktur erkennen lassen (Kennedy 1955). Doch spätere Untersuchungen haben diesen Befund und diese Vorstellungen nicht bestätigen können.

Die Querstreifungsperiode weist in allen Fibrillen immer die gleiche Zahl und Folge von unterschiedlich breiten und dichten Hell-Dunkel-Streifen auf. Innerhalb einer Lamelle liegen

die Perioden gewissermaßen "in Register". Jedoch fand Gieseking (1962) in Dünnstschnittpräparaten, wie schon vor ihr Nemetschek, Grassmann und Hofmann (1955) an einzelnen benachbarten Fibrillen aus Zupfpräparaten, eine spiegelbildliche Anordnung der Querstreifungsmuster bei Fibrillen eines und desselben Fibrillenbündels. Sie führt dies auf die zufällige Ausrichtung der ersten beiden miteinander reagierenden Tropokollagen-Moleküle zurück und mißt dieser spiegelbildlichen Ausrichtung insofern eine funktionelle Bedeutung zu, als die reifen Fibrillen im Verbande voneinander isoliert und gegeneinander verschieblich bleiben.

Eine Querstreifung zeigen im elektronenmikroskopischen Bild lediglich die Kollagen- und die Retikulumfibrillen, nicht dagegen die elastischen Fasern. Diese Untersuchung soll klären, ob die kollagenen Fibrillen in Dünnstschnitten des harten Gaumens den Sehnenfibrillen oder den Retikulumfibrillen zuzuordnen sind, wobei die Dicke der Fibrillen das wesentliche Unterscheidungsmerkmal darstellt. Des weiteren sollen Erkenntnisse über den quantitativen Anteil der Kollagenfraktion am Grundsubstanzvolumen sowie über die Anordnung und Häufigkeit der elastischen Fasern im Bindegewebsverband des harten Gaumens gewonnen werden.

MATERIAL UND METHODE

Das Material aus dem harten Gaumen erwachsener Ratten (Wistar-Stamm) wurde nach zwei verschiedenen Verfahren fixiert:

1.) 60 - 90 Minuten mit 2,5 %igem Glutaraldehyd in 1/1o M Cacodylat-Puffer p_H 7,4;

waschen in 1/1o M Cacodylat-Puffer;

nachfixieren zwei Stunden mit 1 %iger Osmiumsäure in 1/1o M Cacodylat-Puffer p_H 7,4.

2.) 60 - 90 Minuten in 1,4 %igem Glutaraldehyd in 1/1o M Cacodylat-Puffer pH 7,4 und 0,15 % Rutheniumrot;

waschen in 1/1o M Cacodylat-Puffer p_H 7,4 und 0,08 % Rutheniumrot;

2 Stunden nachfixieren mit 2 %iger Osmiumsäure in 1/1o M Cacodylat-Puffer und 0,04 % Rutheniumrot.

Im Anschluß an die Osmiumsäure-Nachfixierung wurden die Präparate beider Gruppen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen.

Entwässert wurde in einer aufsteigenden Acetonreihe. Das entwässerte Material wurde stufenweise in MIKROPAL (Polyester-Kunstharz der Fa. Ferak, Berlin) eingebettet. In einem Wärmofen wurden die kleinen Mikropal-Zylinder drei Tage lang bei einer Temperatur von 60°C gehärtet.

Die Dünnschnitte wurden am Reichert- und LKB-Ultrotome (thermischer Objektvorschub, Glasmesser) gewonnen. Unter mikroskopischer Kontrolle wird das Objekt dabei in rhombischer Bewegung an dem ruhenden Messer entlanggeführt. Die so erhaltenen, 100 - 300 A dicken Schnitte werden in einer direkt hinter der Schneidekante

des Glasmessers aus einer Metallfolie gebildeten und mit Paraffin gegen das Glas abgedichteten kleinen Wanne in destilliertem Wasser aufgefangen und zum Trocknen herausgenommen.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung muß das Dünnschnitt-Objekt durch Einlagerung von Schwermetallionen nachkontrastiert werden. Man behandelt die Schnitte dazu nacheinander mit Uranylacetat und Bleicitrat.

Für die Aufnahmen verwendeten wir ein Siemens-Elmiskop mit Doppelkondensor und einer Strahlspannung von 80 kV.

Die Bestimmung der Fibrillendicke erfolgte mit Hilfe einer achtfachen Meßlupe an insgesamt 200 quergeschnittenen Fibrillen bei den Endvergrößerungen 35 000 : 1 und 50 000 : 1. Die gemessenen Werte wurden zu Intervallen von je 10 mμ Breite zusammengefaßt und in ein Koordinatennetz eingetragen.

Ferner wurden, wiederum bei Aufnahmen mit unterschiedlichen Vergrößerungen, 50 Querstreifungsperioden an längsgeschnittenen Fibrillen ausgemessen und der Mittelwert sowie die Grenzwerte der Schwankungsbreite bestimmt.

Bei der Bestimmung des Volumenanteils der Kollagenfraktion in unseren Gewebeschnitten aus dem harten und weichen Gaumen gingen wir, wie in der stereometrischen Analyse zulässig und mathematisch zu begründen, von der Annahme aus, daß der Volumenanteil einer Komponente, deren Objekte statistisch im Gesamtvolumen verteilt sind, mit ihrem Flächenanteil identisch ist. Der Flächenanteil der Kollagenfraktion wurde mit einem "Digiscan" mit Phasenintegrator der Fa. KONTRON, München, gemessen. Hierbei wird das Objekt, Fibrillenbündel im

Querschnitt, mäanderförmig unter einem Lichtstrahl abgerastert. Gemessen wird in der optischen Achse. Die Transmissionswerte werden in einer Fotozelle in elektrische Spannungen umgesetzt, und diese Spannungen speisen den Phasenintegrator zur weiteren Auswertung. Da die elektrischen Spannungen der Extinktion umgekehrt proportional sind, lassen sich bei der Abtastung der Diapositive die Orte "höherer Dichte" als Spannungsminima erfassen. Die zu messenden Objekte - in unserem Falle die Kollagenfibrillen (Phase I) - lassen sich also von den amorphen Bildbestandteilen (Phase II) nach ihren Grauwerten mit den Diskriminatoren I und II unterscheiden. Der Kollagenfraktion entsprach bei dem verwendeten Diapositiv der Meßbereich zwischen 1,16 V und 3,05 V; diese Grenzwerte hängen natürlich von der Dichte des Dias ab und werden von Fall zu Fall festgelegt. Auf Grund der sehr hohen Zahl von Messungen erhält man einen statistisch repräsentativen Wert für das Verhältnis der Impulse Phase I zu den Impulsen Phase II, aus dem sich die prozentualen Volumina der Fraktionen errechnen lassen.

BEFUNDE

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Dünnstschnitten durch den harten Gaumen der Ratte nach Fixation mit Osmiumsäure oder Rutheniumrot und Schwermetallkontrastierung zeigen Kollagenfibrillen im Quer-, Schräg- und Längsschnitt, zu einem geringen Teil einzeln und ungeordnet, größtenteils aber geordnet zu Fasern und Faserbündeln, die in allen Ebenen verlaufen und sich unter den verschiedensten Winkeln kreuzen. Es liegt demnach ein mehr oder weniger regelmäßiges Gitterwerk vor. Gelegentlich verliert sich eine Fibrille oder ein Teil einer Faser in eine andere Bildebene und taucht dann wieder auf, so daß auf einen welligen oder spiraligen Verlauf der Fibrillenbündel geschlossen werden kann.

Auf gut getroffenen Querschnitten bemerkt man, daß innerhalb einer Faser nicht die dichtestmögliche hexagonale Packung vorliegt, sondern daß jeweils mehrere Kollagenfibrillen (durchschnittlich 7) zu einschichtigen, durch fibrillenfreie Räume voneinander isolierten Lagen oder Lamellen angeordnet sind, die zuweilen wie Abschnitte konzentrischer Kreise um den gedachten Mittelpunkt des Fibrillenbündels wirken. Diese Lamellen können sich verzweigen (s. Abb. 1).

Die Kontur der einzelnen Kollagenfibrille läßt sich in der Regel deutlich verfolgen; sie ist rund. Schrägschnitte können Ellipsenform vortäuschen. Eine Verschmelzung benachbarter Fibrillen kommt nicht vor, ebenso wenig wie eine Verzweigung oder Auffaserung von Fibrillen. Die Einzelfibrillen liegen in Kittsubstanz eingebettet, die das trennende und zugleich

verbindende Medium darstellt. Hier und dort gewahrt man in der wegen ihrer geringeren elektronischen Dichte hell erscheinenden Kittsubstanz winzige Körnchen und fädige Strukturen, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Tropokollagen-Makromoleküle vor ihrer Vereinigung zu Fibrillen handelt. Bei stärkeren Vergrößerungen fällt auf, daß der runde Querschnitt vieler Fibrillen durch Anlagerung solcher Tropokollagen-Makromoleküle Ausbuchtungen hat oder geradezu einer Rosette gleicht. Innerhalb einer Lamelle bilden diese sehr dünnen Fibrillen oft eine Brücke von einer dickeren Fibrille zur benachbarten.

Untersucht man bei stärkerer Vergrößerung den Querschnitt der einzelnen Fibrille, so läßt sich ein feiner dunklerer Rand von einer helleren, jedoch nicht homogenen Innenzone unterscheiden.

Bei Vergrößerungen etwa ab 50 000 : 1 tritt die bekannte Querstreifung der Kollagenfibrillen zutage (s. Abb. 2). Die weitere Auflösung der Querstreifungsperiode in einzelne Bänder gelang bei den von uns angewandten Vergrößerungen nicht und gehörte auch nicht zu den Aufgaben der vorliegenden Arbeit.

Die Ausmessung von 50 Querstreifungsperioden ergab Werte von 490 Å bis 650 Å mit einem Mittelwert von 590 Å, der sich also nicht ganz mit dem aus zahlreichen Untersuchungen bekannten, röntgeninterferometrisch bestätigten Wert von 640 Å deckt. Vereinzelt wurden auch Kollagenfibrillen mit einer Periode um 200 Å gefunden.

Die elastische Faser tritt mengenmäßig weit hinter der Kollagenfaser zurück. Man erkennt sie an ihrer Homogenität. In ihrem Innern liegen Büschel feiner Filamente, die den Eintritt

in die Bildebene oder den Austritt aus dieser kennzeichnen und bei höheren Vergrößerungen auch in Längsschnitten recht gut zu verfolgen sind (Abb. 3). Als mittleren Durchmesser dieser Filamente erhielten wir 70 Å. Die nicht nur im Zupfpräparat (Schnitt-Schall-Verfahren), sondern auch im Dünnstschnitt stets leicht "gelockten", hier und da auch wirbelähnliche Strukturen bildenden elastischen Fasern zeigen in unseren Schnitten keine direkte Beziehung zu den kollagenen Fibrillen im Sinne einer Anlagerung oder Verschmelzung; indessen scheinen aus der Faser austretende Filamente in die interfibrilläre Kittsubstanz einzustrahlen. Auch an den wie aufgespleißt wirkenden Enden der elastischen Faser sieht man Filamentbündel in die Kollagenfäserchen hineingreifen.

Eine Querstreifung zeigen die elastischen Fasern nicht.

Neben vereinzelten Bindegewebszellen fällt gelegentlich eine Fettzelle auf, in deren Umgebung sich kreuzende und überschneidende Kollagenfibrillen gehäuft vorkommen (Abb.4). In der engeren Umgebung von quergeschnittenen markhaltigen und marklosen peripheren Nervenfasern sind ausschließlich q u e r - geschnittene Kollagenfibrillen zu sehen. Die Fibrillen verlaufen also offenbar parallel mit den Nervenfasern. Kapillaren haben diese Begleitfibrillen nicht; wohl aber scheinen hier und dort kollagene Fibrillen in die Basalmembran einzustrahlen.

Die stereometrische Messung des Kollagenanteils am Volumen eines Fibrillenbündels ergab 67,36 % Kollagen für den harten Gaumen

der Ratte und 31,34 % für den weichen Gaumen des gleichen Tiers.

Die Ausmessung von 200 kollagenen Fibrillen ergab Dicken von 10 mμ bis 100 mμ . Die Höchstwerte lagen zwischen 50 und 60 mμ , gefolgt von den Gruppen 30 - 40 mμ und 40 - 50 .

Die eingipflige Kurve mit einem ausgeprägtem Maximum kommt der Normalverteilungskurve nahe (s. Abb. 5).

Dickenverteilung kollagener Fibrillen im harten Gaumen der Ratte

mμ	Anzahl
10 - 20	8
21 - 30	15
31 - 40	37
41 - 50	39
51 - 60	51
61 - 70	26
71 - 80	16
81 - 90	6
91 - 100	2

DISKUSSION

Über die Struktur eines mattenähnlichen Bindegewebes, wie wir es beim harten Gaumen des Säugers vorfinden, liegen bisher keine elektronenmikroskopischen Untersuchungen vor. Der harte Gaumen ist insofern von exemplarischem Interesse, als es sich hier um ein auf Druck und Tangentialschub (Scherkräfte) beanspruchtes Bindegewebe handelt. Man kann daher ein räumliches Geflecht aus Fibrillenlagen, Fasern oder Faserbündeln erwarten.

Damit ist ein Unterschied gegeben zu der aus zahlreichen Arbeiten bekannten, fast durchweg parallelen Ausrichtung der Kollagenfibrillen in der Schwanzsehne der Ratte (Kuhnke u. Wohlfarth-Bottermann 1956, Schwarz 1961, Gieseking 1962) oder der überwiegend parallelen, aber gelegentlich durch seitlich einstrahlende Fäserchen vernetzt erscheinenden Packung der Fibrillen in der menschlichen Achillessehne (Pahlke 1954, Schwarz 1961, Fick, Fricke et al. 1960).

Unsere Dünnstschnitte zeigten auch in der Tat ein Geflecht aus kollagenen Fäserchen und Fibrillenbündeln ohne eine allgemeine Vorzugsrichtung, wenn man von den "Begleitfibrillen" der Nervenfasern einmal absieht, die diese vor schädigenden Dehnungen schützen. Eingebettet liegen diese Fibrillen in eine elektronenmikroskopisch leere Substanz, die Kittsubstanz, die nur im versilberten Präparat sichtbar ist.

Wird diese bindegewebige Matte beim Zerkleinern der Nahrung örtlich druckbelastet, so wandeln die wegen ihres hohen Elastizitätsmoduls nur um etwa ein Zwanzigstel ihrer

Länge dehnbaren Kollagenfasern infolge ihrer räumlichen Gitterstruktur den Druck in die ihnen adäquate Zugbelastung um.

Eingestreute Fettzellen, bei denen es sich nicht um Speicher-, sondern um Baufett handelt, fangen die Belastung plastisch auf und üben damit eine Polsterwirkung aus.

Die nicht sehr zahlreichen, aber durch ihre Dicke und homogene Transparenz auffallenden elastischen Fasern sorgen dank ihrer Dehnbarkeit (sie beträgt mehr als 100 %) für die Rückstellung des durch die Belastung verformten Fibrillen-Kittsubstanz-Systems.

Das von uns angewandte Dünnstschnittverfahren erlaubt die Darstellung der elektronenoptischen Objekte im Gewebsverband in ihrer natürlichen Lagebeziehung; indessen ist beim Dünnstschnitt eine Aussage über die Art der Fibrillen bzw. ihren Reifungsgrad nicht so ohne weiteres möglich. Während bei der in früheren Jahren häufig angewandten feinanalytischen Methode, die auf der Isolierung der Fibrillen durch hochfrequenten Schall beruht (Schmitt, Hall und Jakus 1942; Wolpers 1943), eine Zuordnung zum retikulären oder kollagenen Typ aufgrund des Versilberungsmodus der isolierten Fibrillen ("periodische Außenversilberung" der Retikulinfibrille und "periodische Innenversilberung" der reifen Kollagenfibrille) keine wesentlichen Schwierigkeiten bereitet (Schwarz 1955), können wir im Schnittpräparat die Frage, ob es sich um retikuläre oder kollagene Fibrillen handelt, nur auf der Basis eines Dickenvergleichs beantworten.

In den Schnitten aus dem harten Gaumen be-

begegnen wir nur ganz selten Fibrillen mit weniger als 10 mμ Durchmesser. Soweit diese im Verbande eines Fäserchens oder Bündels vorkommen, handelt es sich wahrscheinlich um Tropokollagen-Makromoleküle bzw. um Filamente, die noch nicht den Anschluß an eine Fibrille gefunden haben. Bezeichnenderweise bemerkt man diese dünnsten Objekte bei Betrachtung quergeschnittener Fibrillen vornehmlich im Zuge einer aus 6 - 10 Fibrillen bestehenden Lamelle oder Lage, wo sie manchmal eine Brücke zwischen benachbarten Fibrillen zu bilden scheinen.

Diese Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß der harte Gaumen - im Gegensatz zu anderen bindegewebigen Matten, die meist retikulärer Natur sind - keine Retikulinfasern aufweist und seine Festigkeit den reifen kollagenen Strukturen verdankt. Er ist also den Sehnengeweben zuzuordnen.

Dieser Befund kann nicht überraschen. Die Ratte bereitet aus ihrer Nahrung durch gründliches Zerkleinern eine Art "Schliff", wobei sogar Zellulose aufgeschlossen wird, und dies geschieht unter erheblicher Mitwirkung des harten Gaumens, der die Funktion eines Widerlagers hat. Eine relativ dünne Gewebsschicht ist dabei hohen Druckbelastungen und bedeutenden Scherkräften ausgesetzt, an die es sich durch die Ausbildung dicht gepackter kollagener Fibrillenbündel und Fasern in dreidimensionaler Verflechtung angepaßt hat. Kennzeichnend für diese Anpassung ist ferner der auffallend hohe Anteil der Kollagenfraktion am Gesamtvolumen eines kollagenen Faserbündels (= Fibrillen + interfibrilläre Kittsubstanz). Er beträgt nach den Ergebnissen

der stereometrischen Analyse rund 67 %; entsprechende Messungen am Bindegewebe des weit schwächer und andersartig belasteten weichen Gaumens ergaben vergleichsweise nur 31 %; also ist hier die Kittsubstanzmenge etwa doppelt so groß.

Die bei lichtmikroskopischer Betrachtung von Sehnenquerschnitten auffallende Felderung, die durch die dicht aneinandergelagerten Bündel oder Faszikel zustande kommt, wiederholt sich in der elektronenoptischen Dimension. Hier entsteht sie dadurch, daß sich parallel verlaufende Fibrillen zu Lamellen und diese wiederum zu Fibrillengruppen, Fäserchen und Fasern zusammenlagern. Am Beispiel der menschlichen Achillessehne hat Schwarz (1961) einen wellenförmigen Verlauf der einzelnen Fibrillen innerhalb einer Lage, aber eine spiralige Windung der Lagen oder Gruppen zu Strähnen und der Strähnen zu Faszikeln nachgewiesen. Für die kollagenen Einheiten des harten Gaumens gilt nach unseren Befunden das gleiche Prinzip, dessen Sinn offenbar in dem Angebot einer Dehnungsreserve besteht, die durch Entspiralisierung aufgebraucht werden kann. Bei mittleren Vergrößerungen sieht man hier und dort einen Schwarm von Fibrillen aus einer Strähne abschwenken und aus der Schnittebene verschwinden, um in einiger Entfernung wieder in den Verband zurückzukehren.

Außer dem Verhältnis Fibrillen : Kittsubstanz ist die Dicke der Fibrillen ein Kriterium für die Belastbarkeit eines Bindegewebes auf Zug und Druck. Die Dickenmessung von 200 Fibrillen im Querschnitt ergab Werte zwischen

10 mμ und 100 mμ mit einem deutlichen Maximum bei 50 - 60 mμ und geringer Streuung. Da bei der Einbettung des Materials das Wasser erst durch Aceton und dann stufenweise das Aceton durch Mikropal ersetzt wurde, muß man nicht mit einem Volumenverlust infolge Eintrocknung rechnen und darf die Meßwerte - vom subjektiven Fehler abgesehen - als verläßlich betrachten.

Es überraschen dabei die im Vergleich mit Fibrillen der Rattenschwanzsehne steile, gedrängte Form der Verteilungskurve und das Fehlen sehr dicker Fibrillen, wie sie bei reifem, zugfestem Sehnenkollagen vorherrschen. Das Gewebe des harten Gaumens fügt sich also weder in die Reihe der retikulären Mattengewebe oder Interstitien des Säugetiers ein, noch weist es, obgleich den sehnigen Geweben zuzurechnen, die für reife Sehnen typische Fibrillen-Dickenverteilung auf, die, wie z.B. bei der Achillessehne des erwachsenen Menschen mit 30 - 1300 mμ , zu höheren Werten tendiert und deren Kurve mit zunehmendem Alter des Individuums flacher und gestreckter wird (Fick, Fricke et al. 1960).

Da unser Material von ausgewachsenen Ratten stammt, wären bei echtem Sehnengewebe noch dickere Fibrillen zu erwarten gewesen. Dieser scheinbare Widerspruch - Zuordnung des harten Gaumens zum Sehnengewebe einerseits und auf der anderen Seite eine Fibrillen-Dickenverteilung, wie sie nicht ganz der Sehne entspricht, wohl aber dem normalen Corium (Schwarz 1960) - läßt sich von der Funktion her erklären: Sehnen werden pro Querschnittflächeneinheit zweifellos stärker zugbean-

sprucht als entsprechende Fasern oder Faserbündel eines sehnigen Mattengewebes.

Bei stärkeren Vergrößerungen läßt sich die Querstreifung der Kollagenfibrillen gut erkennen. Eine hochdifferenzierte Unterteilung der Querstreifungsperiode in 10 oder sogar 13 Bänder, wie sie bei Fixation mit Phosphorwolframsäure und Schwermetall-Nachkontrastierung möglich ist, gelang bei unserem Fixationsverfahren mit Osmiumsäure und Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat nicht. Die Fixation mit Osmiumsäure wie auch mit Kaliumpermanganat ergibt ein gröberes, weniger gut unterteiltes Querstreifungsmuster (Nemetschek 1957), Die Länge der Querstreifungsperiode betrug bei unseren Aufnahmen im Mittel 590 Å, also 50 Å weniger als der bekannte, durch Röntgeninterferometrie als "große Röntgenperiode" von Bear (1944) bestätigte Wert von 640 Å, der ja durchaus keine absolute Größe darstellt. Vielmehr schwanken die Periodenlängen von 500 Å bis 800 Å, wobei der Wert 640 Å nur der statistische Mittelwert aus zahlreichen Messungen ist.

Vielleicht läßt sich die geringfügige Abweichung vom Mittelwert durch die Untersuchungen von Nemetschek (1963) erklären, der einen verkürzenden Einfluß der Polymerisation des Einbettungskunststoffs auf die Länge der Querstreifungsperiode nachgewiesen hat. So erhielt er bei der Rattenschwanzsehne an einem mit Osmiumtetroxyd fixierten und mit Phosphorwolframsäure nachkontrastierten Dünnschnitt-Präparat eine Querstreifungsperiode von nur 500 Å. Schmitt (1944) und Bear (1944) haben auch röntgenographisch eine Verkürzung

der Periode nach Einwirkung chemischer Fixationsmittel festgestellt.

Neben der Makroperiode fanden wir im harten Gaumen noch eine Unterperiode von 190 - 200 Å, die, wenn man die Einbettungsschrumpfung berücksichtigt, wohl identisch ist mit der 210 Å-Periode. Diese Unterperiode wird zwar in embryonalem und retikulärem Gewebe (Pratt und Wyckhoff 1950, Porter 1952, v.d.Hooff 1957) öfter angetroffen und ist von Schwarz (1957) neben der 640 Å - Periode im Lungeninstitium sowie in der Cornea nachgewiesen, aber in der Sehne bisher noch nicht gefunden worden. Es ist festzustellen, daß diese 210 Å - Periode um so seltener auftritt, je dicker die Fibrillen sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die harten Gaumen von 3 Ratten elektronenmikroskopisch untersucht. Das Bindegewebe zeigt eine mattenförmige Textur. Die einzelnen Fasern laufen nicht parallel zueinander wie in einer Sehne, sondern sind mattenförmig verflochten. Dadurch wird der Kaudruck umgespannt in Zug. Einzelne Fettzellen bremsen den Druck durch plastische Verformung. Elastische Fasern ziehen nach Sistieren des Kaudrucks die Gewebsformation wieder in ihre alte Lage.

Die Kollagenfasern sind zusammengesetzt aus Kollagenfibrillen, die dem Typus des reifen Sehnenkollagens angehören. Das zeigt uns die Dickenverteilung. Die Fibrillen sind quergestreift mit einer Periode von 590 Å. Dieser Wert liegt noch in der Schwankungsbreite der 640 Å - Periode. Daneben kommt eine Unterperiode von 210 Å vor, die bisher nur im Embryo und in der Cornea gemessen wurde.

LITERATUR

Bear, R.S.: X-ray diffraction studies on protein fibers. I. The large fibers axis period of collagen. J.Amer. Chem.Soc. 66, p. 1297-1305 (1944).

Boedtker, H. and P. Doty: On the nature of the structural element of collagen. J. Amer.Chem.Soc. 77, No 1, p. 248 - 249 (1955).

Brenner, S., and R.W.Horne: A negative staining method for high resolution electron microscopy and viruses. Bioch. biophys.Acta (Amst.) 34, p.103 - 110 (1959).

Dettmer, N., J.Neckel u. H.Ruska: Elektronenmikroskopische Befunde an versilberten kollagenen Fibrillen. Z.Mikrosk. 60, 290 (1951).

Dettmer, N.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an elastischen Fasern im Flügelband der Taube und ihre Beziehungen zum übrigen Bindegewebe. Z.Zellforsch. 37, 89 (1952).

Fick,K., R.Fricke, G.Gattow, F.Hartmann u. W.Schwarz: Untersuchungen über die Struktur und Funktion des Bindegewebes. 5.Mitteilung: Die Differenzierung des Sehnenbindegewebes während des Wachstums und ihre Beeinflussung durch desmotrope Pharmaka. In: Zeitschr.f.Rheumaforschg., Sonderdruck Bd.19, Heft 9/10, S.293-310 (1960).

Herrath, E.v., N.Dettmer: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gitterfasern. Z.f.wiss.Mikrosk. 60, S. 282 - 289 (1951/52).

Hodge, A.J. and F.O.Schmitt: The charge profile of the tropocollagen macromolecule and the packing arrangement in native-type collagen fibrils. Proc.Nat.Acad.Sci., Vol.46, No 2, S.186-197 (1960).

Hörmann, H. in: Der Rheumatismus. Bd. 37. Binde- und Stützgewebe. Symposion Bad Bramstedt 1965. Steinkopf Verlag, Darmstadt 1966.

Hooff, A.v.d.: A few remarks on connective tissues rich in mucoid. In: Connective tissue, a symposium by CIOMS, edit. by Tunbridge, p. 172-176. Oxford: Blackwell Sci.Publ. 1957.

Kennedy, J.J., Science 121, p. 673 (1955).

Kuhnke, E., und K.E.Wohlfarth-Bottermann: Neue Befunde zur Struktur der Sehnenfibrille an Hand von Dünnschnitten. Proc. Stockholm Conf.Electr. Micr., S.223 - 225 (1956).

Nemetschek, Th., W.Grassmann und U.Hofmann: Über die hochunterteilte Querstreifung des Kollagens. Z.Naturforsch. 10b (2), S. 61-68 (1955).

Nemetschek, Th.: Die unterteilte Querstreifung von Kollagen nach Behandlung mit Kaliumpermanganat. Naturwiss. 44 (23), S.623-624 (1957).

Nemetschek, Th.: Einwirkung von Kaliumpermanganat auf Kollagen. In:Beiträge zur Silikoseforschung. S-Bd Grundfragen d.Silikoseforsch. Bd.5 (1963) S. 217 - 233.

Pahlke, G.: Z.Zellforsch. 39, S.421 (1954).

Schmitt, F.O., C.E.Hall und M.A.Jakus: Electron microscope investigations of the structure of collagen. J.Cellul. a. Comp.Physiol. 20, p. 31-33 (1942).

Schmitt, F.O.: X-ray and electron microscope studies of the structure of collagen fibers. J.Amer.Leather Assoc. 39, No 11, p. 430-441 (1944).

Schmitt, F.O., J.Gross and J.H.Highberger: A new particle type in certain connective tissue extracts. Proc.Nat. Acad.Sci. (Washington) 39, p. 459-465 (1953).

Schwarz, W.: Über die Morphologie der verschiedenen Bindegewebsfasern unter besonderer Berücksichtigung des Kollagens. In: Beiträge zur Silikoseforschung, S-Bd: Grundfragen aus der Silikoseforschung. Bd.1, S.173-183 (1955).

Schwarz, W.: Die Zwischensubstanzen des Bindegewebes. Sonderdruck: Kapillaren und Interstitium. Hamburger Symposion v. 29 bis 31.Okt. 1954. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955.

Schwarz, W.: Heutige Vorstellungen über die ultramikroskopische Struktur des Bindegewebes. In: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes. II. Symposion an der Mediz.Univ.-Klinik Münster (Westf.) am 16. u. 17. Okt. 1959. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1960.

Schwarz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau und die Bildung der Sehne. Sonderdruck aus: Verhandlg. Deutsch.Orthopäd.Ges., 48.Kongreß Berlin, S. 38-44. Ferdinand Enke, Stuttgart 1961.

Schwarz, W. und Graf Keyserlingk,D.: Über die Feinstruktur der menschlichen Cornea, mit besonderer Berücksichtigung des Problems der Transparenz. Z.Zellforsch. 73, 540-548 (1966).

Tromans, W.J., Horne, R.W., Gresham, G.A. and Bailey, A.J.: Electron microscope studies on the structure of collagen fibrils by negative staining. Z.Zellforsch., 58, 798-802 (1963).

Wolpers, C.: Klin. Wochenschr. 1943, 624.

Wolpers, C.: Die Querstreifung der kollagenen Bindegewebsfibrille. Virchows Archiv 312, S.292-302 (1944).

Wolpers, C.: Das Scheiben- und Lamellenstadium der Kollagenquerstreifung. In: Molekulare Chemie, Bd 2, S. 37-47 (1948).

ABBILDUNGEN

Abb. 1 Gruppierung der Kollagenfibrillen zu Lamellen, die aus durchschnittlich 7 - 1o, oft bogenförmig angeordneten Fibrillen bestehen. Verzweigung von Lamellen (⇐). Aufzweigung eines Lamellenbündels (⇐|). Quergeschnittene Zellfortsätze von Fibrocyten (⇐||).35 000:1-

Abb. 2 Die Querstreifung der Kollagenfibrillen. 120 000 : 1.

Abb. 3 Elastische Faser mit Filamenten (⇐). 77 000 : 1.

Abb. 4 Fettzelle in der rechten oberen Bildhälfte. Gehäuftes Vorkommen von Einzelfibrillen, Lamellen und Bündeln in der Umgebung der Fettzelle. 17 500 : 1.

Abb. 5 Dickenverteilung kollagener Fibrillen im Bindegewebe des harten Gaumens der Ratte.

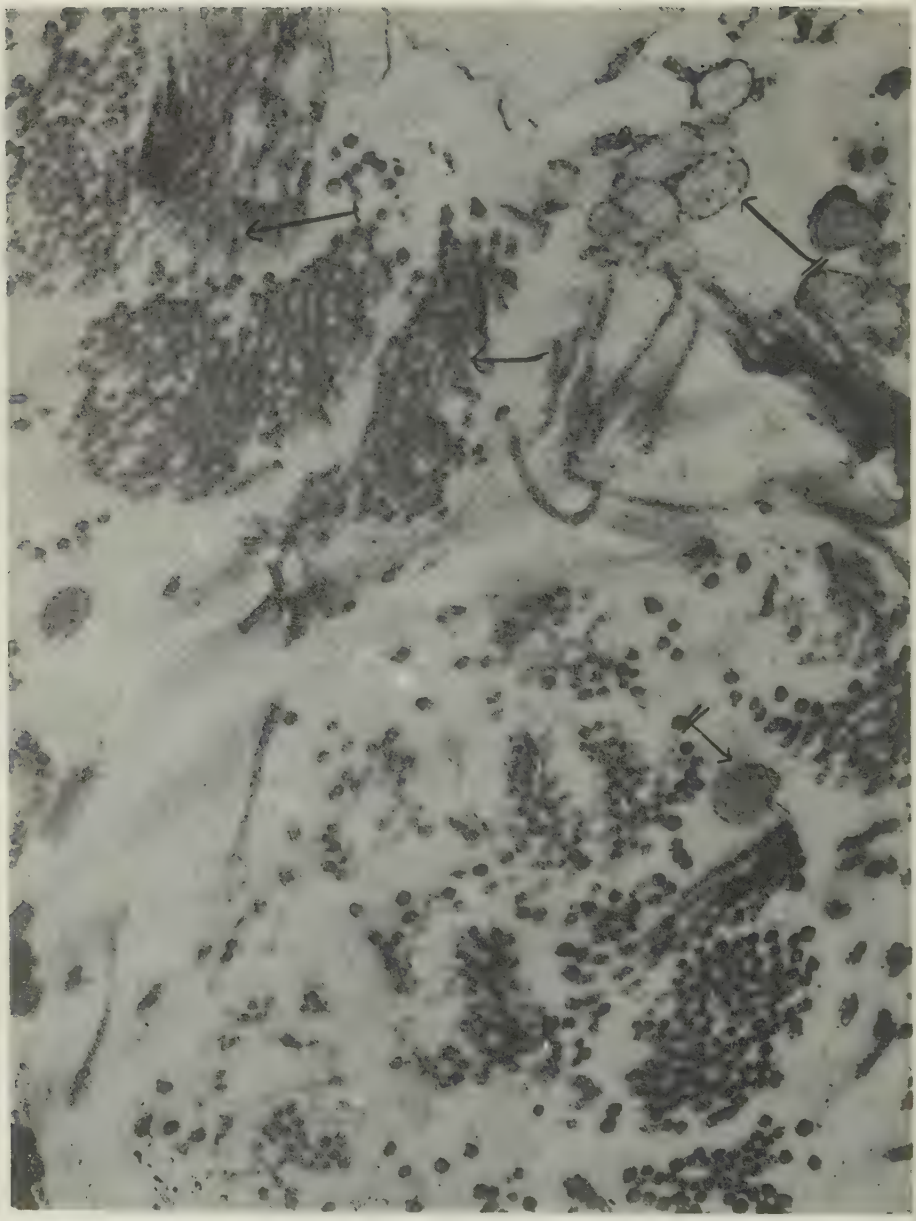

Bild 1

Bild 2

Bild 3

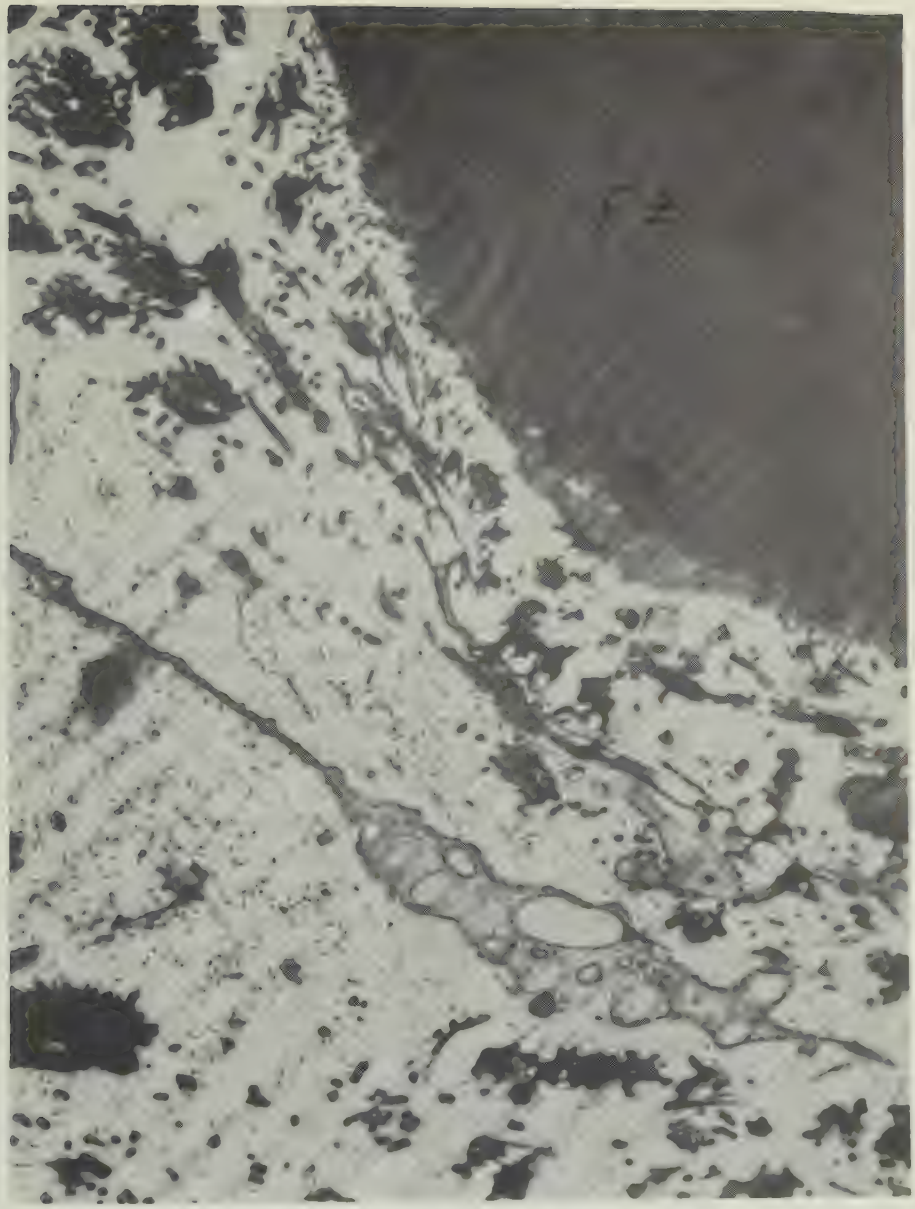

Bild 4

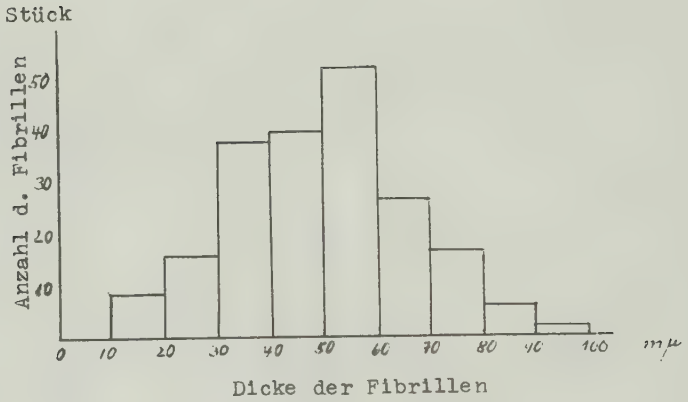
Stück
Anzahl d. Fibrillen
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
mμ
Dicke der Fibrillen

Bild 5

LEBENSLAUF

Am 6. April 1922 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Hermann Friedrich Gleistein und seiner Ehefrau Änne in Hamburg geboren.

Ich besuchte Internatsschulen in Mecklenburg und bei Hamburg und zog 1937 nach Berlin. Die Reifeprüfung legte ich am Heinrich von Kleist-Gymnasium im Januar 1941 ab; darauf wurde ich zur Wehrmacht einberufen. Nach vier Jahren Kriegsdienst in Rußland und zwei Jahren Gefangenschaft ebendort kehrte ich nach Berlin zurück und begann nach längerer Genesungszeit, mich auf einen Verlagsberuf vorzubereiten. Als Verlagsvolontär legte ich das englische Dolmetscherexamen ab und vervollständigte meine russischen Sprachkenntnisse.

Als Redakteur der russischen Sprachgruppe eines Nachrichtendienstes war ich rund ein Jahrzehnt tätig. Nach meinem Ausscheiden arbeitete ich freiberuflich als Lektor für einen Hamburger Verlag und als Übersetzer. Mehrere russische Romane und Theaterstücke sind von mir ins Deutsche übertragen worden.

Im Herbst 1961 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin, und nach zehn Semestern legte ich das Staatsexamen mit der Note "Gut" ab

Seither führe ich in Berlin eine zahnärztliche Praxis zusammen mit meiner Frau.